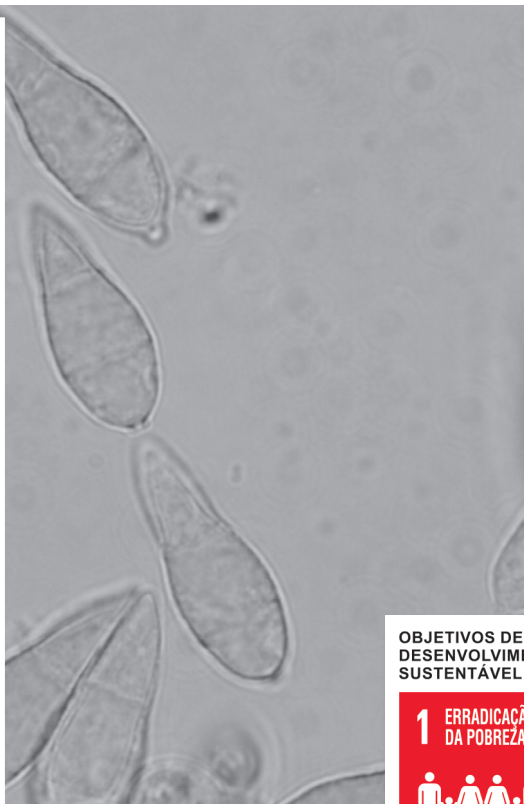
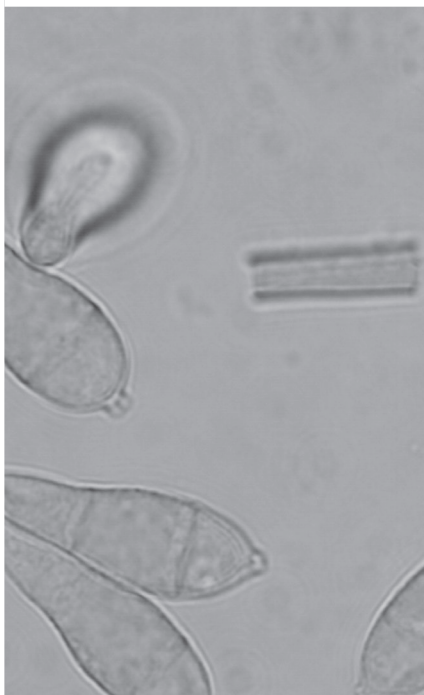


Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

1 ERRADICAÇÃO
DA POBREZA



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
54**

**Protocolo de Extração de DNA Genômico para
os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz**

*Livia Teixeira Duarte Brandão
Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes
Marta Cristina Corsi de Filippi
Valácia Lemes Silva-Lobo*

***Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2019***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão
Rod. GO 462, Km 12, Zona Rural
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533-2105
Fax: (62) 3533-2100
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações

Presidente
André Ribeiro Coutinho

Secretária-Executiva
Tereza Cristina de Oliveira Borba

Membros
Aluísio Goulart Silva, Ana Lúcia Delalibera de Faria, Fábio Fernandes Nolêto, Luiz Roberto Rocha da Silva, Luciene Frões Camarano de Oliveira, Luis Fernando Stone, Márcia Gonzaga de Castro Oliveira, José Manoel Colombari Filho, Roselene de Queiroz Chaves

Supervisão editorial
Luiz Roberto Rocha da Silva

Revisão de texto
Luiz Roberto Rocha da Silva

Normalização bibliográfica
Ana Lúcia Delalibera de Faria

Tratamento das ilustrações
Fabiano Severino

Editoração eletrônica
Fabiano Severino

Foto da capa
Livia Teixeira Duarte Brandão

1ª edição
On-line (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Protocolo de extração de DNA genômico para os principais fungos fitopatogênicos do arroz / Livia Teixeira Duarte Brandão ...[et al.]. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2019.
15 p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 54)

1. Arroz – Extração – DNA. 2. Arroz – Fungo micélio. I. Brandão, Livia Teixeira Duarte. II. Côrtes, Marcio Vinicius de Carvalho Barros. III. Filippi, Marta Cristina Corsi de. IV. Silva-Lobo, Valácia Lemes. V. Embrapa Arroz e Feijão. VI. Série.

CDD 572.8

Ana Lúcia D. de Faria (CRB 1/324)

© Embrapa, 2019

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Microrganismos	8
Cultivo dos isolados fitopatogênicos	8
Determinação da quantidade e da qualidade do DNA	10
Resultados e Discussão	10
Conclusão.....	14
Referências	15

Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz

Lívia Teixeira Duarte Brandão¹

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Cortes²

Marta Cristina Corsi de Filippi³

Valácia Lemes Silva-Lobo⁴

Resumo - Para obter êxito no uso das técnicas de biologia molecular é fundamental a obtenção de DNA genômico de boa qualidade, livre de impurezas e com a maior integridade possível. O objetivo do trabalho foi estabelecer e padronizar protocolo para a extração de DNA genômico dos patógenos de arroz de maior importância no Brasil, *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* e *Magnaporthe oryzae* (anamorfo: *Pyricularia oryzae*), a partir do método de extração de DNA de plantas descrito por Dellaporta et al. (1983). Os 14 isolados fúngicos provenientes da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão foram cultivados em meio líquido caldo batata dextrose e em meio sólido ágar batata dextrose a 25 °C, por sete a dez dias, e a extração de DNA genômico foi realizada para as massas miceliais obtidas. Foram obtidas concentrações de DNA superiores a 370 ng/μL, tanto para as amostras com micélio liofilizado macerado quanto para as amostras com micélio raspado da placa, sem liofilizar e sem macerar. As razões entre as absorbâncias a 260 nm e a 280 nm apresentaram-se entre 1,8 e 2,2 para 13 das 14 amostras de DNA extraídas de micélio liofilizado macerado e para 12 das 14 amostras de DNA extraídas do micélio raspado da placa. As razões entre as absorbâncias a 260 nm e a 230 nm estiveram na faixa de 1,8 a 2,2 para seis dos 14 isolados testados com o micélio liofilizado macerado e para três dos 14 isolados testados com micélio raspado da placa. O método de extração

¹ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

² Farmacêutico, mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

³ Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia e Microbiologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁴ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

de DNA Dellaporta modificado mostrou-se eficiente para a extração de DNA dos fungos patogênicos ao arroz testados.

Termos para indexação: Extração de DNA de *Magnaporthe oryzae*, método Dellaporta modificado, micélio fúngico.

Protocol for Genomic DNA Extraction for Main Rice Phytopathogenic Fungi

Abstract - Molecular biology techniques require the use of good quality genomic DNA, free from impurities and with the highest possible integrity. The objective of this study was to establish and standardize the protocol for extraction of genomic DNA from rice pathogens of greater importance in Brazil, *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* e *Magnaporthe oryzae* (anamorfo: *Pyricularia oryzae*), starting from the plant DNA extraction method described by Dellaporta et al. (1983). Fourteen fungal isolates from the Collection of Multifunctional and Phytopathogenic Microorganisms of Embrapa Rice & Beans were cultivated in potato dextrose broth liquid medium and in potato dextrose agar medium at 25 °C for seven to ten days, and extraction of genomic DNA was performed for the obtained mycelial masses. DNA concentrations higher than 370 ng/μL were obtained for both macerated lyophilized mycelium and mycelium scraped of the plate without lyophilization or maceration. The ratio of absorbance at 260 nm to 280 nm was between 1.8 and 2.2 for 13 out of 14 DNA samples from macerated lyophilized mycelium and for 12 out of 14 DNA samples from mycelium scraped of the plate. The 260/230 absorbance ratio ranged from 1.8 to 2.2 for six out of 14 isolates tested with macerated lyophilized mycelium and for three out of 14 isolates tested with plate scraped mycelium. The modified Dellaporta method proved to be efficient for DNA extraction from the rice-pathogenic fungi tested.

Index terms: *Magnaporthe oryzae* DNA extraction, modified Dellaporta method, fungi mycelium.

Introdução

As técnicas de biologia molecular permitem acessar e avaliar o genótipo e a variabilidade no nível de DNA. Os trabalhos de clonagem e genotipagem tornaram-se rotina em laboratórios de pesquisa fúngica, e para que se obtenha êxito no uso dessas tecnologias um dos fatores essenciais é a obtenção de DNA genômico de boa qualidade, livre de impurezas e com a maior integridade possível. A obtenção de DNA de alta qualidade, a partir de tecido fúngico, requer muito tempo e trabalho e é, frequentemente, um passo limitante para experimentos em que há necessidade de alto rendimento, por isso um processo de extração eficiente requer um processo de lise celular eficiente para a extração de DNA e que o recupere adequadamente para a amplificação (Abdel-Latif; Osman, 2017).

A extração de DNA fúngico é um processo de múltiplas etapas, incluindo o crescimento do fungo em meio líquido ou sólido, o rompimento da parede celular, a remoção de proteínas e a precipitação do DNA. Diversos métodos de extração de DNA fúngico têm sido desenvolvidos por vários pesquisadores (Trypathy et al., 2017), no entanto os métodos tradicionais são demorados e requerem produtos químicos tóxicos, tais como brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodecil sulfato de sódio (SDS), β -mercaptoetanol, fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (Cheng; Jiang, 2006).

Os patógenos do arroz de maior importância no Brasil são os fungos *Bipolaris oryzae*, agente causal da mancha parda, *Microdochium oryzae*, agente causal da escaldadura das folhas, *Rhizoctonia solani*, agente causal da queima das bainhas, *Sarocladium oryzae*, agente causal da podridão das bainhas e *Magnaporthe oryzae* (anamorfo: *Pyricularia oryzae*), agente causal da brusone das folhas e das panículas (Silva-Lobo et al., 2019). O objetivo deste trabalho foi estabelecer e padronizar protocolo para a extração de DNA genômico desses diferentes patógenos de arroz, a partir do método de extração de DNA de plantas descrito por Dellaporta et al. (1983), que permita obter maiores concentrações e melhor qualidade de DNA de forma eficiente e menos onerosa para futuros estudos.

Material e Métodos

Microrganismos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Embrapa Arroz e Feijão. Foram utilizados diferentes isolados de espécies patogênicas ao arroz: *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* e *Magnaporthe oryzae*, provenientes da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão.

Cultivo dos isolados fitopatogênicos

As colônias dos diferentes fungos foram cultivadas em meio líquido BD (caldo batata dextrose) e, a seguir, foram feitos testes também utilizando o meio sólido BDA (ágar batata dextrose), conforme descrito a seguir.

Cultivo em caldo batata dextrose (BD)

Um disco de meio de cultura de cada fungo contendo micélio de uma colônia bem desenvolvida, recente e sem contaminação, foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo BD. Os frascos foram incubados a 25 °C, por sete dias, sob agitação de 150 rpm a 180 rpm. O meio de cultura líquido, contendo colônias crescidas, foi filtrado a vácuo para separar o meio de cultura da massa micelial, a qual foi transferida para tubo Falcon de 50 mL, e congelado a -20 °C por 24 horas, seguido de 24 horas de liofilização. A massa micelial foi macerada no tubo Falcon com o auxílio de bastão de vidro e o pó obtido armazenado a -20 °C, até o momento da extração do DNA.

Crescimento dos fungos em meio ágar batata dextrose (BDA)

Um disco de meio de cultura de cada fungo contendo micélio de uma colônia bem desenvolvida, recente e sem contaminação foi transferido para placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio de cultura BDA. Em seguida as placas foram incubadas a 25 °C por sete a dez dias, sob luz constante. O micélio foi removido com uma lâmina de vidro estéril e a massa micelial foi

transferida para microtubos de 1,5 mL e armazenada a -20 °C até o momento da extração do DNA.

A extração de DNA genômico dos fungos foi realizada para massas miceliais, obtidas utilizando-se duas metodologias diferentes para o crescimento do fungo, conforme protocolo descrito a seguir.

Protocolo para extração de DNA genômico de fungos patogênicos ao arroz

O protocolo para extração de DNA genômico de fungos aqui descrito foi otimizado a partir do método de extração de DNA de folhas (Dellaporta et al., 1983).

- 1) Remover o micélio da colônia do fungo da placa de Petri, transferindo-o para microtubo de 1,5 mL e macerar com o auxílio de ponteira ou bastão de vidro, ou transferir o pó do micélio do fungo liofilizado para microtubo de 1,5 mL, caso esse tenha crescido em meio de cultura líquido. Recomenda-se um pequeno volume de micélio em pó, de aproximadamente 100 µL;
- 2) Adicionar 500 µL de tampão de extração pH 8,0 (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM);
- 3) Agitar por dois minutos em vortex;
- 4) Adicionar 33 µL de SDS 20%;
- 5) Agitar por dois minutos em vortex;
- 6) Incubar a 65 °C por 30 minutos em banho-maria, agitando as amostras a cada dez minutos (vortex 30 segundos);
- 7) Adicionar 160 µL de acetato de potássio a 5 mM;
- 8) Agitar em vortex por dois minutos;
- 9) Centrifugar a 14.000 rpm, em temperatura ambiente, por dez minutos;
- 10) Remover o sobrenadante (~400 µL) e transferir para um novo microtubo (1,5 mL);
- 11) Adicionar 330 µL de isopropanol (álcool isopropílico);
- 12) Inverter suavemente 50X;

- 13) Centrifugar a 14.000 rpm, em temperatura ambiente, por dez minutos;
- 14) Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o decantado (*pellet*);
- 15) Adicionar 500 µL de álcool 70%, centrifugando por 30 segundos (spin) e descartando o sobrenadante com cuidado para não perder o *pellet*;
- 16) Adicionar novamente 500 µL de álcool 70%, centrifugando por 30 segundos (spin) e descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o *pellet*;
- 17) Adicionar 250 µL de álcool absoluto;
- 18) Centrifugar a 14.000 rpm por cinco minutos;
- 19) Descartar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar naturalmente por 40 a 60 minutos;
- 20) Adicionar 50 µL de tampão TE 1X e bater no fundo do tubo para ressuspender o *pellet* contendo o DNA (caso o *pellet* não se dissolva completamente, colocar o microtubo em geladeira por 24 horas);
- 21) Armazenar em freezer a -20 °C até o momento do uso.

Determinação da quantidade e da qualidade do DNA

A concentração do DNA genômico obtida das amostras dos isolados dos fungos foi determinada utilizando-se os comprimentos de onda de 260 nm, para a quantificação de ácidos nucleicos e de 230 nm e 280 nm para a quantificação das impurezas, em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-2000 UV-Vis).

Resultados e Discussão

As diferentes concentrações de DNA obtidas para cada um dos isolados de fungos analisados para micélio liofilizado e macerado e micélio raspado da placa, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de ácidos nucleicos obtida pelo protocolo de extração de DNA descrito por Dellaporta e modificado.

Isolados	Concentração de DNA (ng/μl) com micélio liofilizado macerado	Concentração de DNA (ng/μl) com micélio raspado da placa
Ho82	1469	1444
Md01	609	5729
Md02	2421	3922
Rs144	1520	1456
Rs249	809	1122
Rh4F1	2098	413
Py 11217	2656	2134
Py 11216	1381	2723
Py 10900	1309	3818
Py 11208	1508	2832
So 02	371	1829
So 13	2271	560
So 03	1293	968
So 30	3141	1718

Ho: isolados de *Bipolaris oryzae*; Md: isolados de *Microdochium oryzae*; Rs: isolados de *Rhizoctonia solani*; Py: isolados de *Magnaporthe oryzae*; So: isolados de *Sarocladium oryzae*.

Observou-se que foram obtidas concentrações satisfatórias de DNA porque para 22 das 28 amostras testadas, as concentrações de DNA foram superiores a 1000 ng/μL, tanto para as amostras com micélio liofilizado macerado quanto para as amostras com micélio raspado da placa, sem liofilizar e sem macerar. Em casos em que a concentração foi inferior a 1000 ng/μL, os valores obtidos variaram de 370 ng/μL a 960 ng/μL, consideradas concentrações suficientes para a maioria das aplicações em biologia molecular.

As razões entre as absorbâncias das amostras a 260 nm e 280 nm e 260 nm e 230 nm (A260/280 e A260/230) foram determinadas e estão nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Razões das leituras das absorbâncias das amostras a 260 nm e 280 nm (A260/280) para as extrações de DNA realizadas com micélio liofilizado macerado e micélio raspado da placa, pelo método Dellaporta modificado.

Isolados	A260/280 micélio liofilizado macerado	A260/280 micélio raspado da placa
Ho82	1,85	2,12
Md01	2,13	2,05
Md02	2,07	2,07
Rs144	1,98	2,14
Rs249	2,09	2,07
Rh4F1	2,02	2,04
Py 11217	2,04	1,9
Py 11216	2,06	2,02
Py 10900	2,06	2,17
Py 11208	2,07	1,96
So 02	2,06	1,54
So 13	1,9	1,68
So 03	1,98	1,82
So 30	1,7	1,96

Ho: isolados de *Bipolaris oryzae*; Md: isolados de *Microdochium oryzae*; Rs: isolados de *Rhizoctonia solani*; Py: isolados de *Magnaporthe oryzae*; So: isolados de *Sarocladium oryzae*.

A razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm determina a pureza do DNA extraído, e valores de 1,8 a 2,2 correspondem a amostras de DNA com alta pureza (NanoDrop, 2009). Neste trabalho, observou-se quedas nas razões A260/280, obtidas para as 14 amostras de DNA extraídas de micélio liofilizado macerado pelo método Dellaporta, em que 13 apresentaram-se entre 1,8 e 2,2. Quanto às 14 amostras de DNA extraídas do micélio raspado da placa, 12 delas apresentaram as razões A260/280 entre 1,8 e 2,2. Valores inferiores a 1,8 podem indicar a presença de proteínas, de fenol ou outros contaminantes. Os valores de 1,54 a 1,7 foram observados nas amostras de *Sarocladium oryzae*, o que ocorreu apenas com um isolado de micélio liofilizado macerado e dois isolados de micélio raspado da placa.

Tabela 3. Razões das leituras das absorbâncias das amostras a 260 nm e 230 nm (A260/230) para as extrações de DNA realizadas com micélio liofilizado macerado e micélio raspado da placa, pelo método Dellaporta modificado.

Isolados	A260/230	A260/230
	micélio liofilizado macerado	micélio raspado da placa
Ho82	1,26	1,93
Md01	2,10	1,79
Md02	1,67	1,56
Rs144	1,10	1,80
Rs249	1,53	1,50
Rh4F1	1,25	1,58
Py 11217	1,96	1,14
Py 11216	1,99	1,69
Py 10900	1,90	2,40
Py 11208	2,08	1,66
So 02	1,95	0,77
So 13	1,47	0,66
So 03	1,58	0,96
So 30	1,02	1,34

Ho: isolados de *Bipolaris oryzae*; Md: isolados de *Microdochium oryzae*; Rs: isolados de *Rhizoctonia solani*; Py: isolados de *Magnaporthe oryzae*; So: isolados de *Sarocladium oryzae*.

Por outro lado, a razão entre as absorbâncias a 260 nm e a 230 nm é considerada uma medida secundária da pureza de ácidos nucleicos e os valores satisfatórios para uma amostra de DNA com alta pureza variam, aproximadamente, de 1,8 a 2,2. Com relação à razão A260/230, observou-se que, para a extração de DNA pelo método Dellaporta modificado, as razões estiveram na faixa de 1,8 a 2,2 para seis dos 14 isolados testados com o micélio liofilizado macerado e para três dos 14 testados com micélio raspado da placa. A maioria dos isolados apresentou uma razão A260/230, inferior ao valor ideal, indicando assim a presença de outros contaminantes, tais como sais e polissacarídeos.

A Tabela 4 apresenta a frequência relativa de ocorrência das razões A260/280 e A260/230 nas amostras de micélio liofilizado macerado e micélio raspado da placa, submetidas à extração de DNA pelo método Dellaporta modificado.

Tabela 4. Frequência relativa de ocorrência das razões A260/280 e A260/230 entre 1,8 e 2,2 nas amostras de micélio liofilizado macerado e micélio raspado da placa submetidas à extração de DNA pelo método Dellaporta modificado.

Tipo de micélio para extração	A260/280 (1,8 a 2,2)	A260/230 (1,8 a 2,2)
Micélio liofilizado macerado	87%	40%
Micélio raspado da placa	80%	20%

Observou-se que a frequência relativa de ocorrência das razões A260/280 e A260/230 entre 1,8 e 2,2 foi maior nas amostras de micélio liofilizado macerado do que nas amostras de micélio raspado da placa submetidas à extração de DNA pelo método Dellaporta modificado, indicando uma maior qualidade do DNA extraído para esse tipo de amostra.

Nas extrações de DNA pelo método Dellaporta modificado foram obtidas concentrações de DNA de, no mínimo, 300 ng/ μ L, tanto utilizando micélio liofilizado macerado quanto micélio raspado da placa. Como para a maioria dos isolados testados, a concentração de DNA obtida foi superior a 1000 ng/ μ L, para as duas formas de micélio utilizadas optou-se pela metodologia utilizando-se o micélio raspado da placa, devido à maior praticidade para a obtenção do material para a extração de DNA genômico. A possibilidade da extração de DNA a partir do micélio raspado da placa resultou em uma economia de tempo, com a obtenção de micélio em apenas cinco a sete dias de incubação e a ausência da etapa de liofilização no processo, e também em uma economia de espaço, pelo uso de placas de Petri e não de frascos tipo Erlenmeyer.

Conclusão

O método de extração de DNA Dellaporta modificado mostrou-se eficiente para a extração de DNA dos seguintes fungos patogênicos ao arroz: *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* e *Magnaporthe oryzae*. Além de ser um método que não utiliza reagentes tóxicos, tais como CTAB, SDS, β -mercaptoetanol, clorofórmio, fenol e álcool isoamílico, como a maioria dos protocolos para extração de DNA, o método

Dellaporta modificado possibilita o uso tanto de micélio liofilizado macerado quanto de micélio raspado da placa, embora a utilização de micélio raspado da placa seja a preferida, devido ao menor tempo para a obtenção do micélio, maior simplicidade de cultivo com placas de Petri e menor custo, pois não há necessidade de liofilização. A quantidade de micélio a ser colocada no microtubo deve ser observada, visto que grandes quantidades de micélio também podem resultar em queda na qualidade do DNA obtido.

Referências

ABDEL-LATIF, A.; OSMAN, G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 1-9, Jan. 2017.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 1, p. 55-59, Jan. 2006.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA Miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, Sep. 1983.

NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer - v1.0: user manual revised. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, 2009. Disponível em: <https://www.mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C. C. de; PRABHU, A. S. Manejo de doenças. In: SANTOS, A. B. dos (Ed.). **Arroz**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuzvmwzg02wyiv80166sqfmvtytys.html>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

TRIPATHY, S. K.; MAHARANA, M.; ITHAPE, D. M.; LENKA, D.; MISHRA, D.; PRUSTI, A.; SWAIN, D.; MOHANTY, M. R.; RAJ, K. R. Exploring rapid and efficient protocol for isolation of fungal DNA. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 951-960, 2017.



Arroz e Feijão

